Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Tierexperimentelle Studien über Bildung humoraler Organantikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Gerd Kettner
aus Karlsbad

1964

D 29

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. W.-D. Keidel

Referent: Prof. Dr. med. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 9. 1964

Sonderdruck

Zeitschrift für

GASTROENTEROLOGIE

Klinik und Praxis der Verdauungskrankheiten

Herausgeber: N. Henning, Erlangen, Krankenhausstraße 12

Schriftleitung: K. Heinkel und E. Schmid, Erlangen, Krankenhausstraße

Verlag: Karl Demeter, Gräfelfing/München, Würmstraße 13

Jahrgang 2 (1964) Heft 5 279—284

Aus der Medizinischen Klinik mit Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning)

Tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Organantikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe

von F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ, H. GÖTZ und G. KETTNER

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

In den letzten Jahren wurde wiederholt versucht, im Tierexperiment durch aktive Immunisierung mit homologen Gewebsantigenen pathologische Veränderungen in verschiedenen Organen zu erzeugen, um die Frage zu klären, ob in der Genese chronisch progredienter Organkrankheiten autoimmunologische Mechanismen wirksam sind *[5,6,11,19,20,25,27,29,32,34,36–40]*. Insbesondere ist auch für die chronisch progredienten Leberkrankheiten wiederholt ein Autoaggressionsmechanismus als pathogenetisches Prinzip diskutiert worden. Es gelang, zirkulierende Antikörper gegen homologen Lebergewebsextrakt mit verschiedenen serologischen Techniken nachzuweisen und die spezifische Bindung von Gammaglobulinen bzw. Organantikörpern an besondere Strukturen des pathologisch veränderten Lebergewebes fluoreszenzserologisch darzustellen *[1,4,9,10, 12,15–17,21,23,24,26,28,30–32,35]*.

Unsere tierexperimentellen Studien sollten klären, ob im Verlauf einer Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt Veränderungen der Funktion und des histologischen Bildes der Leber auftreten und welche immunologischen Phänomene mit serologischer und histochemischer Technik nachweisbar werden.

Methodik und Versuchsanordnung

Als Versuchstiere wurden 20 gesunde Kaninchen der Kreuzung Belgische Riesen × Kleinsilber mit einem Gewicht von 2500–3000 g verwendet.

Als Antigen benutzten wir einen homologen Leberextrakt von Kaninchen der gleichen Rasse. Die Leber wurde nach Entbluten des Organs und Beseitigung gröberer bindegewebiger Anteile mit einer Schere zerkleinert und mit Hilfe eines Ultra-Turraxgerätes homogenisiert. Danach wurde das Homogenat von Partikeln durch Zentrifugieren (10 000 U/min für 10 min bei 4° C) abgetrennt, der Rückstand insgesamt viermal dem gleichen Prozeß unterworfen. Das Leberhomogenat wurde zur Standardisierung der Antigenmenge auf seinen Eiweißgehalt (durchschnittlich 1 mg/ml Extrakt) geprüft und steril im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Sensibilisierung der Tiere der ersten Versuchsreihe, bei denen als Antigen Leberextrakt ohne Zusatz von Freundschem Adjuvans zur Verwendung kam, wurde in folgender Weise vorgenommen:

In einer ersten Gruppe (A_1) wurde 5 Versuchstieren das Antigen i. v. in die Ohrvene verabreicht. Die Injektionen erfolgten in zweitägigem Abstand über 21 Tage. Die Dosis wurde von anfänglich 0,3 ml auf 0,5 ml Extrakt pro Einzeldosis gesteigert. Nach vierzehntägiger Injektionspause applizierten wir an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,5 ml Extrakt i. v. Jedes Tier erhielt eine Gesamtdosis von 7,5 mg Extrakteiweiß.

Den 5 Versuchstieren der Gruppe A_2 wurde der Leberextrakt ohne Zusatz von Freundschem Adjuvans teils s. c., teils i. v. gegeben. An 2 aufeinanderfolgenden Tagen injizierten wir je 0,5 ml Extrakt i. v. und gleichzeitig je 1,5 ml Extrakt s. c. Diese Injektionen wurden in siebentägigem Abstand über 4 Wochen wiederholt. Nach 14 behandlungsfreien Tagen erfolgte eine nochmalige Gabe von 2 ml Extrakt s. c. Insgesamt erhielt jedes Tier 18 mg Extrakteiweiß appliziert.

Zur Sensibilisierung der 10 Kaninchen der zweiten Versuchsreihe (Gruppe B) wurde Leberextrakt unter Zusatz von Freundschem Adjuvans*) in einem Verhältnis von 10 : 1 verwendet; der Antigenextrakt wurde in einer Dosis von je 1,5 ml Extrakt an 2 aufeinanderfolgenden Tagen in siebentägigem Abstand über 4 Wochen s. c. gegeben. Nach anschließender vierzehntägiger Pause erfolgte eine weitere s. c. Injektion von 2 ml Extrakt ohne Adjuvanszusatz. Die Gesamtdosis betrug bei dieser Gruppe 16 mg Extrakteiweiß.
Zur Prüfung des Sensibilisierungserfolges wurden folgende Untersuchungen angestellt: den Tieren wurde 4mal in vierzehntägigem Abstand Blut entnommen. Die erste Probe vor Sensibilisierungsbeginn diente zur Bestimmung der Normalwerte. Die letzte Blutentnahme erfolgte 14 Tage nach der letzten Antigenapplikation.

Die Seren wurden folgenden Untersuchungen unterworfen:

Bestimmung des Gesamteiweißes mit der Biuretreaktion nach *Weichselbaum [2]*; papierelektrophoretische Kontrollen der Serumeiweißfraktionen während der Sensibilisierung nach *Grassmann* und *Hannig [14]*; Nachweis zirkulierender Antikörper mit Hilfe der von *Ouchterlony* angegebenen Präzipitationstechnik *[2]* (0,2 ml Leberextrakt gegen Immunseren in geometrischer Verdünnung) und der passiven Hämagglutinationsreaktion nach *Boyden [3]* mit Titerbestimmungen.
56 Tage nach Sensibilisierungsbeginn wurden die Tiere getötet. Die Leber wurde entnommen und histologisch sowie fluoreszenzserologisch untersucht. Die fluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden nach einer Modifikation des von *Coons* angegebenen Verfahrens *[7,8,13,22]* vorgenommen. Zur Markierung der γ-Globuline, die aus den bei der letzten Blutentnahme gewonnenen Kaninchenseren mittels Ammoniumsulfatfällung abgetrennt waren, wurde Fluoreszeinisothiozyanat in einer Dosierung von 0,01 mg/mg Eiweiß verwendet. Die Reinigung der markierten Seren erfolgte einerseits durch Dialyse gegen gepufferte physiologische Kochsalzlösung, andererseits durch Behandlung der Seren mit Rinderleber-Pulver durch Trennung an der DEAE-Zellulosesäule *[13]*. Von den eingefrorenen Leberstücken wurden Gefrierschnitte von 12 μ Dicke hergestellt und diese vor der Inkubierung mit den markierten autologen Seren (30 min bei 37° C im Brutschrank) in Methanol fixiert und anschließend 30 min gewässert. In Kontrolluntersuchungen wurden die Gefrierschnitte zunächst mit autologen nicht fluoreszenzmarkierten Seren bei 30° C 30 min inkubiert und nach Wässerung mit den autologen fluoreszenzmarkierten Seren behandelt. Andere Präparate wurden mit markierten Seren von nichtsensibilierten Tieren behandelt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop. Im einzelnen wurde die Fluoreszenz der Parenchymzellen differenziert nach Zytoplasma und Zellkern, der Gallengänge sowie von Anteilen der Glissonschen Kapsel beschrieben. Ungefärbte Präparate wurden auf Spontanfluoreszenz untersucht.

Ergebnisse

Der Serumgesamteiweißgehalt zeigte während des Beobachtungszeitraumes in allen Gruppen nur geringe Veränderungen. Bei den beiden letzten Kontrolluntersuchungen konnte ein leichter Anstieg des Gesamteiweißgehaltes festgestellt werden (Mittelwert des Gesamteiweißgehaltes vor Sensibilisierungsbeginn 6,4 g%, 56 Tage nach Sensibilisierungsbeginn 7,2 g%). Die papierelektrophoretischen Untersuchungen führten bei den 3 Gruppen zu gleichen Befunden: Während die Albumine keine Konzentrationsänderungen im Verlaufe der Sensibilisierung zeigten, konnte ein vorübergehender geringer Anstieg der α_2-Globuline bei den ersten Kontrolluntersuchungen nachgewiesen werden. Bei späteren Blutentnahmen fand sich ein deutlicher Anstieg der γ-Globulinfraktion (Mittelwert des rel. Globulingehaltes vor Sensibilisierungsbeginn 14,5%, nach 42 Tagen 18,7%).

*) Bacto-Adjuvant, complete *Freund*, Difco-Laboratories Detroit 1, Mich. USA.

Weder in Gruppe A noch in Gruppe B konnten Präzipitationsphänomene mit dem Verfahren nach *Ouchterlony* nachgewiesen werden. Während in Versuchsreihe A die Agglutinationsproben durchweg negativ ausfielen, konnte in Gruppe B im Verlauf der Sensibilisierung ein deutlicher Anstieg der Agglutinationstiter beobachtet werden (Tab. 1)

Ausgangswert	1. Kontrolle	2. Kontrolle	3. Kontrolle	4. Kontrolle
0	0	1 : 4	1 : 32	1 : 128

Tabelle 1: Mittelwerte des Agglutinationstiters nach Sensibilisierung mit Leberextrakt und Freundschem Adjuvans.

Bei den fluoreszenzserologischen Untersuchungen konnte nach Inkubierung von Leberpräparaten der Versuchsreihe A mit dem autologen Serum lediglich eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasma der Parenchymzellen beobachtet werden. In Versuchsreihe B fand sich bei Inkubierung mit autologem und auch mit homologem Serum eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasma und in seltenen Fällen der Kerne der Parenchymzellen. Auffällig war in vielen Präparaten eine deutliche Fluoreszenz von Gallengangsepithelien (Abb. 1) in den großen Gallengängen und den Gallenkapillaren. Die Ergebnisse der fluoreszenzserologischen Untersuchungen bei Inkubierung der Leberpräparate von Tieren der Gruppe B mit autologen und homologen Seren sind in der Tabelle 2 wiedergegeben.
Die Kontrolluntersuchungen bei Vorinkubierung mit nichtmarkierten autologen Seren sowie bei Inkubierung mit Seren nichtsensibilisierter Tiere fielen stets negativ aus. Bei Behandlung von Leberpräparaten nichtsensibilisierter Tiere mit Immunseren konnten ebenfalls keine positiven Befunde erhoben werden.

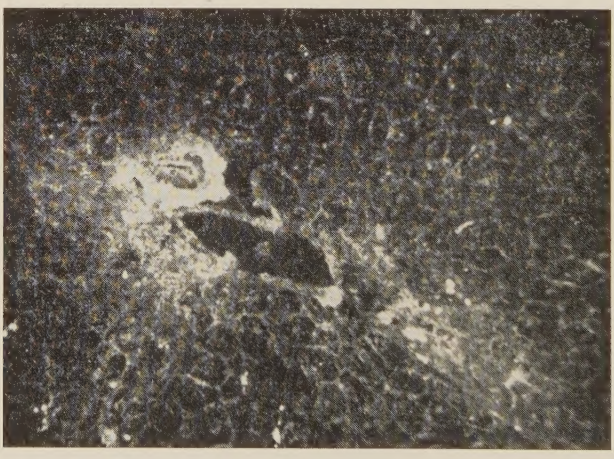

Abbildung 1: Intensiv fluoreszierender Gallengang in einem periportalen Feld nach Behandlung eines Leberschnittes mit autologem fluoreszenzmarkiertem Serum, das 56 Tage nach Beginn der Sensibilisierung der Kaninchen mit homologem Lebergewebsextrakt gewonnen wurde (Vergrößerung 120fach).

	autologes Serum		homologes Serum	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Parenchymzellen				
Zytoplasma	8	2	34	16
Kerne	3	7	7	43
Gallengangsepithelien	7	3	23	27

Tabelle 2: Ergebnisse fluoreszenzserologischer Untersuchung des Lebergewebes von Kaninchen der Gruppe B nach Inkubierung mit autologen und homologen Immunseren.

Bei histologischer Untersuchung der Leberpräparate konnten bei den Versuchsreihen A_1 und A_2 keine pathologischen Besonderheiten nachgewiesen werden. Demgegenüber war in den Leberschnitten der Gruppe B regelmäßig eine zelluläre Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Elementen zu beobachten. Eine Bindegewebsvermehrung fehlte. Die Leberparenchymzellen zeigten lediglich eine trübe Schwellung; Nekrosen von Leberparenchymzellen fanden sich nicht (Abb. 2)*).

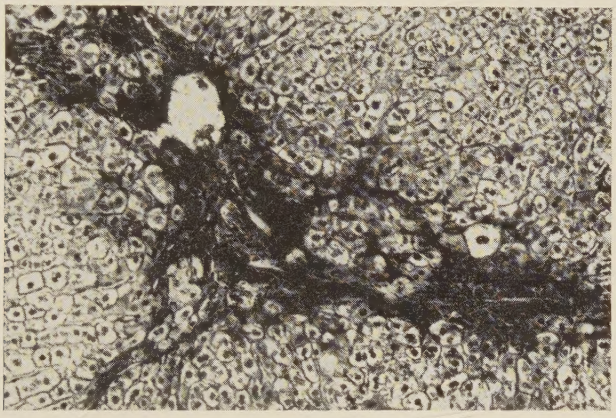

Abbildung 2: Histologisches Präparat einer Kaninchenleber (H.E.-Färbung, Vergrößerung 120fach) nach Sensibilisierung mit homologem Lebergewebsextrakt. Es findet sich zelluläre Infiltration eines periportalen Feldes mit mononukleären Zellen. Die Parenchymzellen zeigen trübe Schwellung. Parenchymzellnekrosen fehlen.

Diskussion

Bei unseren tierexperimentellen Untersuchungen interessierte insbesondere, ob während der Sensibilisierung mit homologem Lebergewebe zirkulierende Antikörper auftreten und ob sich morphologische Veränderungen der Leber entwickeln.

*) Herrn Prof. *Elster*, Pathologisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, danken wir für die Bearbeitung und Beurteilung der Leberpräparate.

Eine Sensibilisierung gegen homologes Organeiweiß gelingt im Tierversuch nur schwer. In unseren Untersuchungen war die Immunisierung mit homologem Leberextrakt erst unter Zusatz von Freundschem Adjuvans erfolgreich und auch hier konnten erst nach Verstärker-Injektion des Antigens nennenswerte Titer von zirkulierenden Antikörpern gefunden werden. Der Anstieg des Serumeiweißgehaltes, besonders der γ-Globuline, weist auf eine gesteigerte immunologische Aktivität des Tierorganismus während der Sensibilisierung hin. Zirkulierende Antikörper konnten in unseren Untersuchungen nur mit Hilfe der passiven Hämagglutinationsreaktion nachgewiesen werden. Präzipitationsversuche im Agar waren stets negativ.

Mit Hilfe der Fluoreszenzreaktion konnte gezeigt werden, daß eine Bindung von γ-Globulin immunisierter Tiere an autologes und an homologes Lebergewebe erfolgt. Von besonderem Interesse ist die wiederholt beobachtete intensive Fluoreszenz der Gallengangsepithelien nach Inkubierung mit autologen Immunseren, die auch bei chronischen Leberkrankheiten des Menschen mehrfach beschrieben wurde *[16,21,26,28]*. Die Darstellung der Parenchymzellkerne in mehreren Präparaten zeigt das Auftreten von antinukleären Faktoren. Bei der Fluoreszenz des Zytoplasma der Leberzellen muß nach den Untersuchungen von *v. Mayersbach [22]* allerdings auch eine unspezifische Reaktion auf Grund der Affinität der durch die Markierung saueren Serumeiweißkörper zum azidophilen Zytoplasma diskutiert werden, während die Darstellungen der basophilen Zellkerne als spezifische Anlagerung von fluoreszenzmarkiertem γ-Globulin anzusehen ist. Das Fehlen der Fluoreszenz in den Kontrolluntersuchungen schließt eine Unspezifität der Reaktion jedoch weitgehend aus.

Inwieweit die beobachteten morphologischen Veränderungen des Lebergewebes mit einer mononukleären Zellinfiltration der periportalen Felder ohne herdförmige oder generalisierte Nekrosen des Leberparenchyms Ausdruck einer spezifischen Sensibilisierung sind, läßt sich noch nicht klären. Sicher entsprechen diese Alterationen nicht dem histologischen Bild der chronisch progredienten Leberkrankheiten des Menschen. Die Untersuchungen von *Ishii* und Mitarbeitern *[18]* sind hier von Interesse. Nach Sensibilisierung mit homologem Lebergewebe bei Kaninchen fanden die Autoren nur geringfügige, bei Ratten aber ausgeprägte morphologische Veränderungen des Lebergewebes im Sinne der chronischen Hepatitis. Da keine serologischen Untersuchungen vorgenommen wurden, bleibt es offen, ob die beobachteten histologischen Befunde Ausdruck eines Immunisierungseffektes sind.

Die Frage, ob Beziehungen zwischen den morphologischen Befunden bestehen, d. h. ob die nachweisbaren zirkulierenden Antikörper eine pathogenetische Bedeutung besitzen, kann auf Grund unserer eigenen und der von anderen Autoren mitgeteilten Ergebnisse noch nicht entschieden werden.

Zusammenfassung: Bei Sensibilisierung von Kaninchen mit homologem Leberextrakt allein konnten zirkulierende Antikörper nicht nachgewiesen werden. Der Zusatz von Freundschen Adjuvantien zum Leberextrakt führte bei langzeitiger Sensibilisierung zur Bildung zirkulierender Antikörper, die mit der passiven Hämagglutinationstechnik nach *Boyden* und fluoreszenzserologisch nach *Coons* erfaßt werden konnten. Bei histologischer Untersuchung der Leberpräparate zeigte sich eine Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Zellen. Leberparenchymzellnekrosen wurden nicht beobachtet.

Literatur

1. *Asherson G. L.:* Brit. J. exp. Path. *40* (1959) 209. — 2. *Berg G., F. Scheiffarth, H. Schön* u. *H. Götz:* Bluteiweiß in N. Henning, klinische Laboratoriumsdiagnostik p. 10, München–Berlin, Urban–Schwarzenberg (1960). — 3. *Boyden S. V.:* J. exp. Med. *93* (1951) 107. — 4. *Cohen S., G. Ohta, E. J. Singer* u. *H. Popper:* J. exp. Med. *111* (1960) 185. — 5. *Collins R. C.:* Ann. J. Ophthal. *32* (1949) 1667. — 6. *Colover J.* u. *L. E. Glynn:* Immunology 1 (1958) 172. — 7. *Coons A. H., H. I. Creech* u. *R. N. Jones:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. *47* (1941) 200. — 8. *Coons A. H.* u. *M. Kaplan:* J. exp. Med. *91* (1950) 1. — 9. *Dausset J.* u. *G. Marchall:* in Immunopathology, Ist Intern. Symposion, Basel, p. 113 *(1959)* B. Schwabe, Basel–Stuttgart. — 10. *Findley G. M., N. H. Martin* u. *J. B. Mitchell:* Lancet *247* (1944) 365. — 11. *Freund J., G. E. Thompson* u. *M. M. Lipton:* J. exp. Med. *101* (1955) 591. — 12a. *Gajdusek D. C.:* Nature (Lond.) *179* (1957) 666. — 12b. *Gajdusek D. C.:* Arch. Intern. Med. *102* (1958) 9. — 13 *Goldstein G., I. Slizys* u. *M. R. Chase:* J. exp. Med. *114* (1961) 89. — 14. *Grassmann W., H. Hannig* u. *M. Knedel:* Dtsch. med. Wschr. *76* (1951) 333. — 15. *Havens W. P. jr.* u. *H. L. Eichmann:* J. Immunol. *64* (1950) 349. — 16. *Henning N., F. Scheiffarth, H. Warnatz, R. Gromotka* u. *H. Nusselt:* Ztschr. Gastroenterologie 1 (1963) 221. — 17. *Hunter F. M., R. W. Sparks* u. *R. T. Salzmann:* Gastroenterologie *39* (1960) 394. — 18. *Ishii K.* u. *S. Yamamoto:* Liver cirrhosis and autoallergy in Aktuelle Probleme der Hepatologie p. 79, II. Symposion Int. Association for the Study of the Liver, München–Reichenhall, G. Thieme, Stuttgart *(1962)*. — 19. *Kies M. W.* u. *E. Aloard:* Allergic encephalomyelitis. Ch. Thomas, Springfield (III.) *(1959)*. — 20. *Lawrence S. H.:* Cellular and humeral aspects of hypersensitive states. P. B. Hoeber (N. Y.) *(1959)*. — 21. *Mackay I. R.:* New Engl. J. Med. *258* (1958) 185. — 22. *v. Mayersbach H.:* Immunhistologische Methoden in der Histochemie, in Graumann und Neumann, Handbuch der Histochemie, G. Fischer, Stuttgart *1958*, p. 598. — 23. *Millot P., M. Saint-Paul* u. *P. Verma:* Ann. Inst. Past. *94* (1958) 599. — 24. *Mori W.* u. *T. Suzuta:* Nature *192* (1961) 41. — 25. *Ortega L. G.* u. *R. C. Mellors:* J. exp. Med. *104* (1956) 151. — 26. *Paronetto F., F. Schaffner* u. *H. Popper:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.) *106* (1961) 216. — 27. *Pfeiffer E. F.:* Verh. dtsch. Ges. inn. Med. *69* (1962) 413. — 28. *Popper H.:* Possible role of immune processes in self perpetuation of liver diseases, in P. Grabar u. P. Miescher, Mechanism of cell and tissue damage, produced by immune reactions. IInd Intern. Symposion on Immunopathology, Brook Lodge (Mich.) p. 303 B. Schwabe, Basel–Stuttgart *(1961)*. — 29. *Rose N. R.* u. *E. Witebsky:* J. Immunol. *76* (1956) 417. — 30. *Schaffner F.* u. *H. Popper:* Nature *196* (1962) 684. — 31. *Scheiffarth F.* u. *G. Berg:* Klin. Wschr. *31* (1953) 441. — 32. *Scheiffarth F., W. Frenger* u. *W. Brichzy:* Klin. Wschr. *31* (1955) 445. — 33. *Steffen C.:* Klin. Wschr. *33* (1955) 134. — 34. *Voison G., A. Delauny* u. *M. Barber:* Ann. Inst. Past. *81* (1951) 48. — 35. *Vorlaender K. O.:* Z. ges. exp. Med. *118* (1962) 352. — 36. *Waksmann B. H.:* J. Exp. Med. *109* (1959) 311; Experimental allergic encephalomyelitis and the autoallergic diseases. LAG S. Karger Basel–New York 1959. — 37. *Waksmann B. H.* u. *R. D. Adams:* J. exp. Med. *102* (1955) 213. — 38. *Waksmann B. H.* u. *S. J. Bullington:* J. Immunol. *76* (1956) 441. — 39. *Witebsky E.:* Verh. dtsch. Ges. inn. Med. *68* (1961) 349. — 40. *Witebsky E.* u. *N. R. Rose:* J. Immunol. *76* (1956) 408.

Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. H. Warnatz, Dr. H. Götz u. Dr. G. Kettner, Med. Univ.-Klinik, 852 Erlangen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538102_0058

Lebenslauf

Am 5. Juni 1936 wurde ich, Sohn des Röntgenologen Dr. med. Gustav Kettner und seiner Ehefrau Johanna, geb. Senft als zweites ihrer zwei Kinder in Karlsbad geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Karlsbad, besuchte dort seit 1942 bis Mitte 1944 die Volksschule und trat nach der Ausweisung Mitte 1946 in die Volksschule Posseck/Kronach ein, um später die Grundschule 1948 in Kulmbach abzuschließen.

Von 1948-1958 besuchte ich das humanistische Gymnasium Kulmbach und legte am 15. Juli 1958 die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Medizin begann ich 1958 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und beendete es nach einem Auslandssemester in Wien am 2. Juli 1964 mit bestandenem Staatsexamen.